

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Oktober 2003 (16.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/084988 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/18**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP03/03732**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
10. April 2003 (10.04.2003)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
02008033.9 10. April 2002 (10.04.2002) EP
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **IMMUSYSTEMS GMBH [DE/DE]**; Oettingenstrasse 34, 80538 München (DE).

- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **DIEPOLDER, Helmut [DE/DE]**; Egeterstr. 17, 80689 München (DE). **JUNG, Maria-Christina [DE/DE]**; Oettingenstrasse 34, 80538 München (DE).
- (74) Anwalt: **GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER**; Maximilianstrasse 58, 80538 München (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 03/084988 A2

(54) Title: **CD4⁺ T-LYMPHOCYTE-SPECIFIC HEPATITIS C VIRUS EPITOPES**

(54) Bezeichnung: **CD4⁺ T-LYMPHOZYTEN SPEZIFISCHE HEPATITIS C VIRUS-EPITOPE**

(57) Abstract: The invention relates to hepatitis C virus epitopes that are CD4⁺ T-lymphocyte specific, in addition to vaccines that contain said epitopes.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Hepatitis C Virus-Epitope, die gegenüber CD4⁺ T-Lymphozyten spezifisch sind, sowie Impfstoffe, die diese Epitope enthalten.

CD4+ T-Lymphozyten spezifische Hepatitis C Virus-Epitope

- 5 Die Erfindung betrifft Hepatitis C Virus-Epitope, die gegenüber CD4⁺ T-Lymphozyten spezifisch sind, sowie Impfstoffe, die diese Epitope enthalten.

Das Hepatitis C Virus, im nachstehenden HCV genannt, wurde 1989 identifiziert und ist ein RNA Virus aus der Familie der Flaviviridae. Es besteht aus einem RNA-Einzelstrang von ca. 9400 Nukleotiden, die ein ca.
10 3000 Aminosäuren langes Vorläuferpolypeptid kodieren. Dieses Polypeptid wird in einem offenen Leserahmen translatiert und posttranslational proteolytisch gespalten. Das Virus ist hochvariabel, und es existieren verschiedene Virusisolate, die als Genotypen bezeichnet werden und deren geographische Verteilung sehr unterschiedlich ist. Mehr
15 als sechs Genotypen werden heute weltweit unterschieden. Diese Genotypen wiederum werden in Subtypen unterteilt. Die genetische Variabilität besteht interindividuell und intraindividuell (innerhalb eines infizierten Individuums). Die intraindividuellen Subtypen sind die
20 sogenannten HCV Quasispezies, verwandte aber unterschiedliche Virussequenzen, die bei ungenauer Replikation entstehen.

Mit einer Prävalenz von ca. ein bis drei Prozent weltweit ist Hepatitis C eine der bedeutendsten chronischen Virusinfektionen. Man geht derzeit von
25 mindestens 180 Mio. infizierten Individuen aus. Nach Berechnungen der Centers of Disease Control in den USA wird es aufgrund der langen Latenzzeit nach der Infektion mit dem HCV außerdem noch zu einem Anstieg der Hepatitis C assoziierten Erkrankungen bis zum Jahre 2010 kommen.

Das HCV wird überwiegend parenteral übertragen und war bis zu seiner Entdeckung die Hauptursache für die Posttransfusionshepatitis NonA-NonB. Durch routinemäßiges Testen aller Blutprodukte mit HCV-Antikörpertests der 2. und 3. Generation hat die Zahl der Posttransfusionshepatitiden drastisch abgenommen. Die sogenannte sporadische Hepatitis C sowie i.v.-
5 Drogenmissbrauch gelten heute als Hauptübertragungswege neuer HCV Infektionen. Es sind derzeit keine Maßnahmen bekannt, um Neuinfektionen auf diesen Wegen wirksam zu verhindern.

10 Das HCV verursacht eine chronische Leberentzündung (Hepatitis), die im langjährigem Verlauf zu weiteren Komplikationen, wie einer Leberzirrhose, führen kann. Im Rahmen einer jahrelang bestehenden Leberzirrhose kommt es bei ca. 5% aller Infizierten zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms. In der westlichen Welt nimmt die Hepatitis C deshalb den ersten
15 Rang als Indikation für die Lebertransplantation ein. Die Kosten für das Gesundheitswesen durch diese Transplantationen sind erheblich.

Bei chronischer Hepatitis C sind zwar gegen fast alle Virusproteine Antikörper nachweisbar, es gibt im Gegensatz zur Hepatitis B jedoch keine
20 Anti-HCV-Antikörperkonstellation, die eine Immunität gegenüber HCV oder eine Ausheilung anzeigt. Auch die Präsenz von Antikörpern gegen das HCV während einer chronischen HCV Infektion mildert den Verlauf nicht. Im Gegenteil scheint eine erfolgreiche Therapie mit einem Absinken der Antikörpertiter verbunden zu sein. Daher ist es nicht möglich, eine Infektion
25 mit Hepatitis C durch eine konventionelle, prophylaktische Impfung mit Hüllprotein, wie sie bei der Hepatitis B erfolgreich durchgeführt wird, zu verhindern. Eine prophylaktische Impfung ist daher derzeit nicht verfügbar.

Die einzige derzeit zugelassene Therapie der chronischen Hepatitis C ist
30 eine Behandlung mit Interferon alpha allein oder in Kombination mit Ribavirin für 6 bis 12 Monate. Diese Therapieform ist sehr kostenintensiv, mit erheblichen Nebenwirkungen belastet und führt nur in ca. 50% der Fälle

zu einer dauerhaften Viruselimination. Peptidepitope enthaltend T-Zellepitope sind bereits identifiziert worden (Diepolder et al. J. Virol. 1997, EP: 00 121 138.2 PCT: WO 02/26785A2). Diese Epitope waren an einem Patientenkollektiv durch Züchtung von virus-spezifischen CD4+ T-Zell
 5 Klonen identifiziert worden.

Hinzu kommt, dass bisherige systematische Untersuchungen im wesentlichen auf Daten basieren, die an Patienten mit einer chronischen Hepatitis C Infektion gewonnen wurden, und eine spontane Elimination des
 10 Virus zu dem Zeitpunkt, an dem bereits eine chronische HCV Infektion vorliegt, äußerst selten vorkommt. Epitope, die an Patienten mit einer chronischen HCV Infektion gefunden wurden sind daher nicht mit der Ausheilung der Erkrankung assoziiert.

15 Daher liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, gegenüber CD4+ T-Lymphozyten spezifische HCV Epitope zu identifizieren, die mit Viruselimination oder Virussuppression assoziiert sind.

Die Lösung der Aufgabe sind CD4⁺ T-Lymphozyten spezifische HCV-
 20 Epitope mit einem Impaktfaktor (IF) \geq Mittelwert (MW)+2*Sta

wobei

$$IF = \frac{n_1 * 1 + n_2 * 1,5}{m} * 100 \quad (\text{Formel 1})$$

25

wobei

n_1 der Summe der Reaktionen mit $3 < SI < 6$,

n_2 der Summe der Reaktionen mit $SI \geq 6$ und

m der Anzahl der Tests gegen das jeweilige Peptid entspricht, wobei $m \geq 15$

30 ist, und MW der Mittelwert aller Impaktfaktoren ist.

Bevorzugt ist der Impcat Faktor der erfindungsgemäßen CD4⁺ T-Lymphozyten spezifischen HCV-Epitope $> MW$ und $\leq MW + 1*Sta$, insbesondere $> MW + 1*Sta$ und $< MW + 2*Sta$, besonders bevorzugt $\geq MW + 2*Sta$.

5

Eine bevorzugte Lösung der Aufgabe sind CD4⁺ T-Lymphozyten spezifische HCV-Epitope, umfassend ein oder mehrere Peptide, ausgewählt aus der Gruppe:

- | | | |
|----|---------|--|
| 10 | (EP001) | GPRLGVRATRKTSER, |
| | (EP002) | ARSLTPCTCGSSDLY, |
| | (EP003) | SSDLYLVTRHADVIP, |
| | (EP004) | MWKCLIRLKPTLHGP, |
| | (EP005) | VLVDILAGYGAGVAG, |
| 15 | (EP006) | THYVPESDAAARVTQILSSL, |
| | (EP007) | TITQLLKRLHQWINECSTP, |
| | (EP008) | CSGSWLRDWDWICTVLTFD, |
| | (EP009) | GAQITGHVKNGSMRIVGPKT, |
| | (EP010) | EVTRVGDFHYVTGMTTDNVK, |
| 20 | (EP011) | CPCQVPAPEFFTEVDGVR LH, |
| | (EP012) | FTEVDGVR LHRYAPACKPLL, |
| | (EP013) | TSMLTDPSHITAETAKRRLA, |
| | (EP014) | SSSASQLSAPSLKATCTTHH, |
| | (EP015) | REVSVA AEILRKSRKFPPAM, |
| 25 | (EP016) | PLLESWKDPDYVPPVHGCP, und |
| | (EP017) | DVCCSMSYTWGTALITPCA sowie Derivate hiervon mit gleicher oder ähnlicher Spezifität. |

- Eine weitere bevorzugte Lösung der Aufgabe sind die nachstehend
- 30 genannten gegenüber CD4⁺ T-Lymphozyten spezifische HCV-Epitope, enthaltend die Sequenz:

- EP001 GPRLGVRATRKTSER
EP002 ARSLTPCTCGSSDLY
EP003 SSDLYLVTRHADVIP
5 EP004 MWKCLIRLKPTLHGP
EP005 VLVDILAGYGAGVAG
EP006 THYVPESDAAARVTQILSSL
EP007 TITQLLKRLHQWINEDCSTP
EP008 CSGSWLRDWDWICTVLTFD
10 EP009 GAQITGHVKNGSMRIVGPKT
EP010 EVTRVGDFHYVTGMTTDNVK
EP011 CPCQVPAPEFFTEVDGVRLH
EP012 FTEVDGVRLHRYAPACKPLL
EP013 TSMLTDP SHITAETAKRRLA
15 EP014 SSSASQLSAPSLKATCTTHH
EP015 REVSVAEILRKSRKFPPAM
EP016 PLLESWKDPDYVPPVHVGCP und/oder
EP017 DVVCCSMSYTWGALITPCA.

- 20 Insbesondere bevorzugt sind die erfindungsgemäßen $CD4^+$ T-Lymphozyten spezifischen HCV-Epitope, ausgewählt aus der Gruppe der Epitope EP001 bis EP0017 mit der vorstehend genannten Sequenz. Diese erfindungsgemäßen Epitope EP001 bis EP017 haben einen Impact factor von $\geq MW+2 \cdot Sta$.

25

- Da diese Epitope im weiteren für eine Immuntherapie der chronischen Hepatitis C bzw. einer Vakzine eingesetzt werden sollen, sind weitere Kriterien ein hoher Grad an Konservierung zwischen verschiedenen Virussubtypen sowie ein hoher Grad an Promiskuität der Bindung an
30 verschiedene HLA-Klasse II Moleküle. Die so identifizierten und charakterisierten HCV-Epitope sollen für einen Impfstoff zur Prophylaxe und/oder Therapie einer HCV-Infektion zur Verfügung stehen.

Zur Lösung der Aufgabe wurde ein einzigartiges Patientenkollektiv identifiziert, nämlich Patienten mit akuter Hepatitis C, die in über 50% der Fälle eine dauerhafte oder zumindest vorübergehende Viruselimination erreichen. Um alle möglichen CD4+ T Zellepitope zu untersuchen wurde das ganze Virus mit überlappenden, synthetischen Peptiden von 15 bis 20 Aminosäuren Länge abgedeckt. Als Testsystem wurde ein standardisiertes Lymphozyten-Proliferationsassay verwendet. Um sowohl den Grad an Konservierung zwischen verschiedenen Virussubtypen als die Bindungspromiskuität hinsichtlich des jeweiligen genetischen Hintergrunds der Patienten zu erfassen, wurde eine Formel definiert, die auf der Häufigkeit der Erkennung eines Epitops und der Stärke der jeweiligen Immunreaktion beruht.

Die Erfindung basiert auf der Auswahl eines besonderen Patientenkollektives, Untersuchungen mit definierten Peptiden und einem Algorithmus zur Identifizierung hochimmunogener CD4+ T-Zellepitope, die für die Entwicklung einer prophylaktischen oder therapeutischen Vakzine geeignet sind.

20

Der Algorithmus bestimmt den „Impaktfaktor“ (IF) des jeweiligen Epitops und definiert sich folgendermaßen:

$$IF = \frac{n_1 * 1 + n_2 * 1,5}{m} * 100 \quad (\text{Formel 1})$$

25

n_1 der Summe der Reaktionen mit $3 < SI < 6$,

n_2 der Summe der Reaktionen mit $SI \geq 6$ und

m der Anzahl der durchgeführten Tests gegen das jeweilige Peptid entspricht, dies dient zur Normierung der Werte. Bei den von uns

gefundenen Peptiden war $m \geq 15$.

30

Der Stimulationsindex (SI) wird üblicherweise aus den Rohdaten eines Proliferationsassays berechnet und stellt den Multiplikationsfaktor der gemessenen Probe gegenüber der Kontrolle dar. Ein SI von 3 gilt als signifikant.

5

Des weiteren wurde der Mittelwert aus den Impaktfaktor aller getesteten Peptide berechnet, wobei jeder Impaktfaktor nach Formel 1 bestimmt wurde. Um relevante Epitope statistisch präzise zu bestimmen, beschränkt sich unsere Lösung der Aufgabe auf die Peptide, deren IF zwei
10 Standardabweichungen über dem Mittelwert aller IF liegen.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet "gegenüber CD4⁺ T-Lymphozyten spezifische HCV-Epitope" eine definierte Region eines Hepatitis C Proteins, die auf Grund ihrer Struktur in die komplementäre
15 Bindungsstelle eines CD4⁺ T-Lymphozyten-Rezeptors "passt" und dadurch hochspezifisch eine Reaktion auslöst.

Da die primäre Aminosäurestruktur der HCV Proteine bekannt ist, wurden hier insgesamt über 450 synthetische Peptide (15-20mere) verwendet, die
20 jeweils zwischen 5 und 10 Aminosäuren überlappen und die bekannten Struktur- und Nichtstruktur-Proteine umspannen.

Kollektiv:

25 Es wurde ein besonderes Patientenkollektiv gewählt und dieses auf für die Ausheilung der Erkrankung relevanten HCV spezifischen CD4⁺ T-Zell-epitope untersucht. Das Patientenkollektiv, nämlich Patienten mit akuter Hepatitis C, ist schwierig zu identifizieren, da einerseits ihr Vorkommen bei einer Häufigkeit von ca. 1:100 000 in der deutschen Bevölkerung liegt und
30 andererseits ausschließlich T-Lymphozyten in der akuten Phase der Erkrankung getestet wurden. Dies bedeutet eine erhebliche Einschränkung der Anzahl der verwendbaren Proben. Schließlich wurden innerhalb dieses

Patientenkollektiv nur Patienten berücksichtigt, die in der Lage waren das Virus spontan zu klären bzw. temporär zu kontrollieren (dies sind nur ca. 60% der Patienten mit akuter Hepatitis C), da nur hier das Immunsystem erfolgreich gegen das Virus vorgegangen ist.

- 5 Hingegen stellt eine spontane Elimination des Virus zu einem späteren Zeitpunkt (chronische HCV) eine Rarität dar. Auch findet sich in der späten, chronischen Phase nur eine geringe oder nicht detektierbare, gegen das Virus gerichtete CD4+ T-Zellantwort. Von herausragender Wichtigkeit sind daher vor allem Epitope, die mit temporärer oder dauerhafter Viruskontrolle
10 einher gehen. Diese Epitope bzw. die gemessene Reaktion auf diese Peptide sind also mittelbar oder unmittelbar mit der Ausheilung der HCV Infektion assoziiert und stellen somit ideale Kandidaten für zukünftige "Peptidimpfungen" dar. Dies trifft auf die erfindungsgemäßen Peptidsequenzen bzw. Peptide zu.

15

Peptide:

- Es wurde ein "Peptidscreening" mit ca. 450 ausgewählten unterschiedlichen Peptiden (15-22mere) hinsichtlich einer virusspezifischen CD4+ T-
20 Zellantwort bei oben beschriebenen Patientenkollektiv durchgeführt.

- Die Peptide repräsentieren das gesamte Virusprotein, wobei wir 15mere mit 5 Aminosäuren langen überlappenden Bereichen bzw. 20-22mere mit 10 Aminosäuren überlappenden Bereichen verwendeten um möglichst alle
25 relevanten Epitope zu erfassen.

- Der Tabelle 1 sind die jeweiligen Positionen in HCV Genom der erfindungsgemäßen Epitope unter Angabe der jeweiligen Virusisolat Referenz zu entnehmen (Tabelle 1 / Spalte 4). Die Angaben zur
30 Aminosäureposition (Tabelle 1 / Spalte 2) sind nur als Näherung zu verstehen, da aufgrund der hohen Mutationsrate des Virus bei den

verschiedenen Virusisolaten zu Änderungen der Position kommen kann. Besondere Bedeutung für prophylaktische und therapeutische Impfungen dürfte den konservierten Epitopen zu kommen, was sich in der gleichbleibenden Sequenz der unterschiedlichen Virusisolate eines Epitops
5 zeigt (s.a. Tabelle 1 / Spalte 5).

Aus früheren eigenen Untersuchungen ging hervor, dass bestimmten Bereichen des Virus besondere immunologische Bedeutung zukommt, deshalb wurden diese Bereiche des Virusgenoms (NS3-NS4) mit Hilfe von
10 Peptiden (20mere mit 10 Aminosäuren langen überlappenden Bereichen) zusätzlich getestet.

In Tabelle 1 sind die erfindungsgemäßen Epitope aufgeführt.

15 Tabelle 1:

Nr.	Pos	IF	Aminosäure Sequenz	Virusisolat Referenz (s.a. Liste 1)
EP001	40	24,0	GPRLGVRATRKTSE	c,3,4,5,6,8,10,12,14,15,16
EP002	1120	27,6	ARSLTPCTCGSSDLY	c,1,2,7,9
EP003	1130	23,2	SSDLYLVTRHADVIP	c,1,2,3,6,7,9,10,15,16
EP004	1610	24,1	MWKCLIRLKPTLHGP	c,1,2,3,6,7,8,12,15,16
EP005	1850	24,1	VLVDILAGYGAGVAG	c,1,2,7,8,10,15,16
EP006	1935	26,7	THYVPESDAAARVTQILSSL	c,1,2,7,8,16
EP007	1955	43,8	TITQLLKRLHQWINE DCSTP	c,1,2,7,8,16
EP008	1975	23,3	CSGSWLRDVWDWICTVL TDF	c,1,2,15,16
EP009	2035	23,3	GAQITGHVKN G SMRIVGPKT	c,1,2,7,8,15
EP010	2095	21,9	EVTRVGDFHYVTGMTTDNVK	c,1,2,8,15,16
EP011	2115	23,3	CPCQVPAPEFFTEVDGVRLH	c,1,8,9,15,16
EP012	2125	28,1	FTEVDGVRLHRYAPACKPLL	c,1,9,15,16
EP013	2175	26,7	TSMLTDPSHITAETAKRRLA	c,2,7,8,9,15,16
EP014	2205	23,3	SSSASQLSAPSLKATCTTHH	c,2,7,8,16
EP015	2275	25,0	REVSVA AEILRKS RKFP PAM	c
EP016	2305	26,7	PLLESWKDPDYVPPV VHGCP	c,1,2,15,16
EP017	2425	23,3	DVVCCSMSYTW TGALITPCA	c,1,2,8,16

Liste 1: Virusisolate**1**

Genotype: 1b AUTHORS Trowbridge,R. and Gowans,E.J.

- 5 TITLE Molecular cloning of an Australian isolate of hepatitis C virus
JOURNAL Arch. Virol. 143 (3), 501-511 (1998)

2

Genotype: 1b AUTHORS Takamizawa,A., Mori,C., Fuke,I., Manabe,S., Murakami,S.,

- 10 Fujita,J., Onishi,E., Andoh,T., Yoshida,I. and Okayama,H.

TITLE Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers

JOURNAL J. Virol. 65 (3), 1105-1113 (1991)

3

- 15 Genotype: 1a AUTHORS Yanagi,M., Purcell,R.H., Emerson,S.U. and Bukh,J.

TITLE Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee

JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (16), 8738-8743 (1997)

4

- 20 Genotype:2a AUTHORS Okamoto,H., Okada,S., Sugiyama,Y., Kurai,K., Iizuka,H.,
Machida,A., Miyakawa,Y. and Mayumi,M.

TITLE Nucleotide sequence of the genomic RNA of hepatitis C virus isolated from a human JOURNAL J. Gen. Virol. 72 (Pt 11), 2697-2704 (1991)

5

- 25 Genotype:2b AUTHORS Okamoto,H., Kurai,K., Okada,S., Yamamoto,K., Iizuka,H.,
Tanaka,T., Fukuda,S., Tsuda,F. and Mishihiro,S.

TITLE Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes

JOURNAL Virology 188 (1), 331-341 (1992)

- 30 **6**

Genotype: 1a AUTHORS CHOO,Q.-L., RICHMAN,K.H., HAN,J.H., BERGER,K., LEE,C.,
DONG,C., GALLEGOS,C., COIT,D., MEDINA-SELBY,A., BARR,P.J., WEINER,A.J.,
BRADLEY,D.W., KUO,G. and HOUGHTON,M.

TITLE Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus

- 35 JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88 (6), 2451-2455 (1991)

7Genotype: 1b AUTHORS Tanaka,T., Kato,N., Nakagawa,M., Ootsuyama,Y., Cho,M.J.,
Nakazawa,T., Hijikata,M., Ishimura,Y. and Shimotohno,K.

- TITLE Molecular cloning of hepatitis C virus genome from a single Japanese carrier:
sequence variation within the same individual and among infected individuals
JOURNAL Virus Res. 23 (1-2), 39-53 (1992)
8
- 5 Genotype:1b AUTHORS Kato,N., Hijikata,M., Ootsuyama,Y., Nakagawa,M.,
Ohkoshi,S.,Sugimura,T. and Shimotohno,K.
TITLE Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese
patients with non-A, non-B hepatitis
JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (24), 9524-9528 (1990)
- 10 9
Genotype:1b AUTHORS Chen,P.J., Lin,M.H., Tai,K.F., Liu,P.C., Lin,C.J. and
Chen,D.S.
TITLE The Taiwanese hepatitis C virus genome: sequence determination and mapping
the 5' termini of viral genomic and antigenomic RNA
15 JOURNAL Virology 188 (1), 102-113 (1992)
- 10
Genotype:1a AUTHORS Inchauspe,G., Zebedee,S., Lee,D.H., Sugitani,M., Nasoff,M.
and Prince,A.M.
TITLE Genomic structure of the human prototype strain H of hepatitis C virus:
20 comparison with American and Japanese isolates
JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88 (22), 10292-10296 (1991)
- 11
Genotype:3b AUTHORS Chayama,K. Toranomon Hospital, Department of
Gastroenterology; 2-2-2 Toranomon, Minato-ku, Tokyo 105, Japan
25 TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (18-FEB-1995) to the DDBJ/EMBL/GenBank databases.
COMMENT D26556:Submitted (20-Jan-1994) to DDBJ by: Kazuaki Chayama.
- 12
Genotype:4 AUTHORS Chamberlain RW, Adams N, Saeed AA, Simmonds P, Elliott
30 RM
TITLE : Complete nucleotide sequence of a type 4 hepatitis C virus variant, the
predominant genotype in the Middle East.
JOURNAL: J Gen Virol. 1997 Jun;78 (Pt 6):1341-7.
- 13
Genotype:5a AUTHORS Chamberlain RW, Adams NJ, Taylor LA, Simmonds P, Elliott
35 RM.
TITLE The complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 5a, the predominant
genotype in South Africa.
JOURNAL Biochem Biophys Res Commun. 1997 Jul 9;236(1):44-9.

14

Genotype: 6a AUTHORS Adams, N.J., Chamberlain, R.W., Taylor, L.A., Davidson, F.,
Lin, C.K., Elliott, R.M. and Simmonds, P.

TITLE Complete coding sequence of hepatitis C virus genotype 6a

5 JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 234 (2), 393-396 (1997)

15

Genotype: 1b AUTHORS Honda, M., Kaneko, S., Unoura, M., Kobayashi, K. and
Murakami, S.

TITLE Sequence comparisons for a hepatitis C virus genome RNA isolated from a
10 patient with liver cirrhosis

JOURNAL Gene 120 (2), 317-318 (1992)

16

Genotype: 1b AUTHORS Okamoto, H., Kojima, M., Okada, S., Yoshizawa, H., Iizuka, H.,
Tanaka, T., Muchmore, E.E., Peterson, D.A., Ito, Y. and Mishiro, S.

15 TITLE Genetic drift of hepatitis C virus during an 8.2-year infection in a chimpanzee:
variability and stability

JOURNAL Virology 190 (2), 894-899 (1992)

17

Genotype: 1a AUTHORS Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW,
20 Houghton M.

Title: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis
genome.

Journal: Science 1989 Apr 21;244(4902):359-62

25 C

Genotype: 1b
Primary consensus sequence complete 1b genomes
available in EMBL database (January 2000)

30

Testsystem:

Als Testsystem wurde der sogenannte Proliferationsassay nach folgendem
Protokoll eingesetzt. Nach Dichtegradientenzentrifugation auf
35 Ficollgradienten von heparinisiertem Blut wurden die frischen peripheren
mononukleären Blutzellen (PBMC) isoliert und in einem Kulturmedium
(RPMI1640, Gibco) suspendiert. 50 µl dieser Zellsuspension (Konzentration
von 1×10^6 Zellen pro ml) wurden auf sterile 96 Loch-Kulturplatten verbracht.

Durch Zugabe der Peptide wurden die Zellen stimuliert. Die Endkonzentration der Peptide betrug 10µg/ml. Die Zellkulturplatten wurden über 5 Tage bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert, anschließend mit ³H-Thymidin versetzt und als Maß für die Zellstimulation wurde der Einbau des radioaktiven ³H gemessen.

Auswertung:

Bei unseren Untersuchungen wurden nur Peptidreaktionen als signifikant angesehen, deren Stimulationsindex (SI) größer 3 war (3x erhöht gegenüber den Kontrollen, bzw. den irrelevanten Peptiden).

Um einerseits die Möglichkeit falsch positiver Reaktionen sowie irrelevanter Kreuzreaktionen zu minimieren und andererseits eine Hierarchie hinsichtlich der biologischen Wertigkeit relevanter Epitope zu erstellen, wurde ein zusätzlicher Filter definiert und im Folgenden als Impaktfaktor (IF) bezeichnet.

Dem Impaktfaktor (IF) liegt ein Punktesystem zugrunde, welches nicht nur die Häufigkeit relevanter Reaktionen, d.h. Stimulationsindex (SI) größer 3, wie herkömmlicherweise, verwendet, sondern auch die Stärke dieser Reaktionen berücksichtigt.

Dieses Bewertungssystem wurde für jedes untersuchte Peptid angewendet und ist nach folgender Formel definiert:

$$IF = \frac{n_1 * 1 + n_2 * 1,5}{m} * 100 \quad (\text{Formel 1})$$

wobei

- 30 n_1 der Summe der Reaktionen mit $3 < SI < 6$,
 n_2 der Summe der Reaktionen mit $SI \geq 6$ und

m der Anzahl der Tests gegen das jeweilige Peptid entspricht, wobei $m \geq 15$ war.

Beispiel:

5

Gegen EP007 wurden in 16 (m) unabhängigen Versuchen folgende spezifischen SI's (Stimulationsindex) gemessen: 0,91; 1,07; 1,10; 1,24; 1,32; 1,33; 1,40; 1,46; 1,81; 1,84; 3,01; 3,25; 4,38; 5,32; 7,58 und 12,77.

- 10 Damit ergibt sich $n_1 = 4$ (4 Werte >3 und <6); $n_2 = 2$ (2 Werte ≥ 6), bzw. eingesetzt in die Formel

$$IF = \frac{4 + 3}{16} * 100 \quad (\text{Formel 1})$$

15

ein Impaktfaktor von 43,75 für dieses Peptid. Da bei den von uns getesteten Peptiden der Mittelwert aller Impaktfaktoren 7,36 und die Standardabweichung 6,75 betrug, entspricht dieser Impaktfaktor von 43,75 einem Wert $\geq MW + 2 * Sta$. Für jedes untersuchte Peptid wurde der jeweilige

20 Impaktfaktor berechnet. Aus allen Impaktfaktoren ließen sich dann Mittelwert und Standardabweichung errechnen.

Somit ergibt sich je nach Höhe des Impaktfaktors eine biologisch-immunologisch bedeutsame Hierarchie. Peptide mit hohem Impaktfaktor

25 zeichnen sich nicht nur durch einen großen Stimulationsindex, d.h. starke spezifische Reaktivität, sondern auch durch die wiederholt d.h. bei unterschiedlichen Personen gefundene spezifische Reaktion aus.

Diese hier getroffene Selektion soll der immunologischen Wertigkeit, der

30 hier aufgeführten Peptide, besser gerecht werden. Epitope, die starke und bei unterschiedlichen Patienten gemessene HCV spezifisch CD4+ T-Zell Antworten auslösen, haben für künftige Impfansätze eine hohe Relevanz.

Die erfindungsgemäßen Epitope zeichnet weiterhin aus, dass eine deutliche spezifische CD4+ T-Zell Aktivität auf diese Peptide mit einer Abnahme des Virustiters korreliert. Gerade diese Epitope dürften somit ideale Kandidaten
5 für eine Vakzine darstellen. Eine spezifisch Impfreaktion gegen diese Peptide, könnte die Erkrankung auf der einen Seite verhindern und/oder auf der anderen Seite zu deren Ausheilung führen, zumindest aber den Verlauf einer HCV Infektion günstig beeinflussen.

10 Die erfindungsgemäßen Epitope sind hochimmunogene, hochkonservierte und zum Teil in unmittelbarer Nachbarschaft zu bekannten CD8+ T-Lymphozyten spezifischen HCV-Epitopen gelegene Sequenzen des HCV. Als gegenüber CD4+ T-Lymphozyten spezifische HCV-Epitope können diese neben der Induktion von CD4+ T-Lymphozyten auch sogenannte T-Zell-
15 Hilfe für zytotoxische CD8+ T-Lymphozyten vermitteln. Diese CD8+-T-Lymphozyten werden durch die Zytokine stimulierter CD4+ T-Lymphozyten aktiviert.

Des weiteren zeichnen sich die Peptide durch häufige signifikante Reaktion
20 bei verschiedenen Patienten mit unterschiedlichen MHC Klasse II Typen (major histocompatibility complex) aus. Das MHC Klasse II System ist ausgesprochen polymorph. Die Aufgabe der MHC Moleküle ist es von körpereigenen und pathogenen (z.B. Hepatitis C Virus) Proteinen stammende Peptidfragmente zu binden und sie zur Erkennung und
25 Aktivierung von spezifischen CD4+T-Lymphozyten an der Zelloberfläche zu exprimieren. Dieses System ermöglicht eine wirkungsvolle und spezifische Immunantwort gegen Pathogene wie z.B. HCV. Da nun verschiedene MHC Klasse II Typen, d.h. unterschiedliche Personen, dasselbe Peptid auf ihrem MHC Klasse II Molekül exprimieren können, was in vitro durch bei
30 unterschiedlichen Personen messbare, gegen dasselbe Peptid gerichtete CD4+ Aktivität wiederfindet, kann bei diesen Peptiden von einer Promiskuität ausgegangen werden. Dies bedeutet, dass die

erfindungsgemäßen Epitope immunologische Relevanz bei verschiedenen Individuen besitzen.

Zusammenfassend eignen sich gerade die erfindungsgemäßen Epitope im hohen Maße sowohl für eine therapeutische als auch prophylaktische Peptidimpfung, die gegen das HCV gerichtet ist.

Eine weitere Lösung ist ein Impfstoff, der eine Kombination der erfindungsgemäßen Epitope EP001 bis EP017 enthält. Der Impfstoff kann insbesondere bevorzugt ein Gemisch aus den erfindungsgemäßen Epitopen EP001 bis EP017 enthalten. Allerdings können auch weitere HCV Epitope anwesend sein.

Die erfindungsgemäßen Epitope können allein oder mit einem oder mehreren Hilfsstoffen als Arzneimittel, vorzugsweise als Impfstoff, eingesetzt werden. Der erfindungsgemäße Impfstoff enthält mindestens ein erfindungsgemäßes Epitop, vorzugsweise ein Gemisch aus erfindungsgemäßen Epitopen. Allerdings können auch weitere HCV Epitope anwesend sein.

Die Hilfsstoffe werden vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus fowlpoxvirus, modifiziertes Vakziniavirus Ankara, Virosomen, Transvax® und anderen die Immunreaktion verstärkenden Stoffen.

Der erfindungsgemäße Impfstoff kann oral, parenteral, intramuskulär, intravenös, subcutan oder intracutan verabreicht werden.

Bei den erfindungsgemäßen Epitopen handelt es sich um Epitope, die als T-Zell-stimulierender Impfstoff eingesetzt werden können. Ein Impfstoff, der die erfindungsgemäßen Epitope enthält, hat gegenüber einer Impfung mit dem gesamten Virusprotein, das verschiedenste Epitope für virusspezifische T-Lymphozyten enthält und nur B-Lymphozyten und

CD4⁺T-Lymphozyten induziert, den Vorteil, dass es spezifische T-Lymphozyten, CD4⁺- und/oder CD8⁺-T-Lymphozyten selektiv induziert. Außerdem werden dadurch antagonistische Effekte bzw. die Gefahr von iatrogen erzeugten Autoimmunreaktionen, die bei Impfungen mit ganzen
5 Proteinen auftreten können, vermieden. Die erfindungsgemäßen Epitope haben zusätzlich eine höhere Immunogenität im Vergleich zu dem gesamten Virusprotein, wodurch ein besseres Impfergebnis erreicht wird.

Der erfindungsgemäße Impfstoff ermöglicht somit im gesunden Menschen
10 die Induktion einer Immunantwort und dient daher als prophylaktische Impfung. Auch bei chronisch HCV-infizierten Menschen kann der erfindungsgemäße Impfstoff eine Immunantwort induzieren und somit als therapeutischer Impfstoff dienen.

15 Die kodierende cDNA dieser Epitope kann in einem DNA-Impfstoff, einer speziellen Impfmethode, eingesetzt werden. Dabei wird die für die entsprechenden Epitope codierende DNA in einen Vector kloniert. Dieses Konstrukt wird wiederum dem zu impfenden Individuum parenteral verabreicht (z.B. Immunology and Cell Biology, Band 75, Seite 382 bis 388).
20 Entsprechend des degenerierten genetischen Codes können verschiedene DNA-Sequenzen eines der erfindungsgemäßen Epitope kodieren (siehe Current protocols, Wiley).

Die erfindungsgemäßen Epitope können auch in der Diagnose des Verlaufs
25 einer HCV-Infektion Verwendung finden, indem die Menge an CD4⁺ T-Lymphozyten, die spezifisch das betreffende Epitop erkennen, im Blut des Patienten mit einer Hepatitis C Infektion überwacht wird. Dies kann beispielsweise mit einem diagnostischen Kit durchgeführt werden, der eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Epitope umfasst.

Sequenzprotokoll

5 <110> Immusystems GmbH
 <120> CD4+Lymphozyten spezifische HCV EPITOPE
 <130> PCT 1854-099
 10 <150> EP 02 008 033.9
 <151> 2002-04-10
 <160> 17
 15 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Hepatitis C virus
 <400> 1
 Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg
 25 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 15
 30 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus
 <400> 2
 35 Ala Arg Ser Leu Thr Pro Cys Thr Cys Gly Ser Ser Asp Leu Tyr
 1 5 10 15
 <210> 3
 40 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus
 <400> 3
 45 Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro
 1 5 10 15
 50 <210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus
 55 <400> 4
 Met Trp Lys Cys Leu Ile Arg Leu Lys Pro Thr Leu His Gly Pro
 1 5 10 15
 60 <210> 5

<211> 15
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

5 <400> 5

Val Leu Val Asp Ile Leu Ala Gly Tyr Gly Ala Gly Val Ala Gly
1 5 10 15

10 <210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

15 <400> 6

Thr His Tyr Val Pro Glu Ser Asp Ala Ala Ala Arg Val Thr Gln Ile
1 5 10 15

20 Leu Ser Ser Leu
20

25 <210> 7
<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

30 <400> 7

Thr Ile Thr Gln Leu Leu Lys Arg Leu His Gln Trp Ile Asn Glu Asp
1 5 10 15

35 Cys Ser Thr Pro
20

40 <210> 8
<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

45 <400> 8

Cys Ser Gly Ser Trp Leu Arg Asp Val Trp Asp Trp Ile Cys Thr Val
1 5 10 15

50 Leu Thr Asp Phe
20

55 <210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

60 <400> 9

20

Gly Ala Gln Ile Thr Gly His Val Lys Asn Gly Ser Met Arg Ile Val
 1 5 10 15

5 Gly Pro Lys Thr
 20

<210> 10
 10 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 10

15 Glu Val Thr Arg Val Gly Asp Phe His Tyr Val Thr Gly Met Thr Thr
 1 5 10 15

20 Asp Asn Val Lys
 20

<210> 11
 25 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 11

30 Cys Pro Cys Gln Val Pro Ala Pro Glu Phe Phe Thr Glu Val Asp Gly
 1 5 10 15

35 Val Arg Leu His
 20

<210> 12
 40 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 12

45 Phe Thr Glu Val Asp Gly Val Arg Leu His Arg Tyr Ala Pro Ala Cys
 1 5 10 15

50 Lys Pro Leu Leu
 20

<210> 13
 55 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 13

60 Thr Ser Met Leu Thr Asp Pro Ser His Ile Thr Ala Glu Thr Ala Lys
 1 5 10 15

Arg Arg Leu Ala
 20
 5
 <210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 10 <213> Hepatitis C virus
 <400> 14
 Ser Ser Ser Ala Ser Gln Leu Ser Ala Pro Ser Leu Lys Ala Thr Cys
 15 1 5 10 15
 Thr Thr His His
 20 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> PRT
 25 <213> Hepatitis C virus
 <400> 15
 Arg Glu Val Ser Val Ala Ala Glu Ile Leu Arg Lys Ser Arg Lys Phe
 30 1 5 10 15
 Pro Pro Ala Met
 35 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 40 <213> Hepatitis C virus
 <400> 16
 Pro Leu Leu Glu Ser Trp Lys Asp Pro Asp Tyr Val Pro Pro Val Val
 45 1 5 10 15
 His Gly Cys Pro
 50 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> PRT
 55 <213> Hepatitis C virus
 <400> 17
 Asp Val Val Cys Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp Thr Gly Ala Leu Ile
 60 1 5 10 15

Thr Pro Cys Ala
20

Patentansprüche

1. CD4⁺ T-Lymphozyten spezifische HCV-Epitope

5

mit einem Impaktfaktor (IF) \geq Mittelwert (MW)+2*Sta

wobei

$$10 \quad IF = \frac{n_1 * 1 + n_2 * 1,5}{m} * 100 \quad (\text{Formel 1})$$

wobei

n_1 der Summe der Reaktionen mit $3 < SI < 6$,

n_2 der Summe der Reaktionen mit $SI \geq 6$ und

15 m der Anzahl der Tests gegen das jeweilige Peptid entspricht, wobei $m \geq 15$ ist, und MW der Mittelwert aller Impaktfaktoren ist.

2. CD4⁺ T-Lymphozyten spezifische HCV-Epitope nach Anspruch 1, umfassend ein oder mehrere Peptide, ausgewählt aus der Gruppe,

20 bestehend aus:

- | | |
|------------|-----------------------|
| (EP001) | GPRLGVRATRKTSER, |
| (EP002) | ARSLTPCTCGSSDLY, |
| (EP003) | SSDLYLVTRHADVIP, |
| 25 (EP004) | MWKCLIRLKPTLHGP, |
| (EP005) | VLVDILAGYGAGVAG, |
| (EP006) | THYVPESDAAARVTQILSSL, |
| (EP007) | TITQLLKRLHQWINECSTP, |
| (EP008) | CSGSWLRDWDWICTVLTDF, |
| 30 (EP009) | GAQITGHVKNGSMRIVGPKT, |
| (EP010) | EVTRVGDFHYVTGMTTDNVK, |

- (EP011) CPCQVPAPEFFTEVDGVRLH,
(EP012) FTEVDGVRLHRYAPACKPLL,
(EP013) TSMLTDPSHITAETAKRRLA,
(EP014) SSSASQLSAPSLKATCTTHH,
5 (EP015) REVSVA AEILRKSRKFPPAM,
(EP016) PLLESWKDPDYVPPVHVGCP, und
(EP017) DVVCCSMSYTWTGALITPCA sowie Derivate hiervon mit
gleicher oder ähnlicher Spezifität.
- 10 3. CD4⁺ T-Lymphozyten spezifische HCV-Epitope mit einer oder
mehreren im Anspruch 2 genannten Sequenzen.
4. CD4⁺ T-Lymphozyten spezifische HCV-Epitope nach einem der
vorstehenden Ansprüche mit einer der Sequenzen EP001 bis EP017.
- 15 5. Impfstoff, mindestens ein HCV-Epitop nach einem der vorstehenden
Ansprüche umfassend.
6. Impfstoff nach Anspruch 5, zusätzlich mindestens einen Hilfsstoff,
20 ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus fowlpoxvirus,
modifiziertem Vakziniavirus Ankara, Virosomen, Transvax, CPG und
anderen die Immunreaktion verstärkenden Stoffen, umfassend.
7. Impfstoff nach einem der Ansprüche 5 oder 6 in Form einer
25 Injektionslösung.
8. HCV-Epitop nach einem der Ansprüche 1 bis 4 als Arzneimittel.
9. Verwendung mindestens eines HCV-Epitops nach einem der
30 Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung einer Zusammensetzung zur
Prophylaxe und/oder Therapie einer Hepatitis C Infektion.

10. Verwendung mindestens eines HCV-Epitop nach einem der Ansprüche 1 bis 4 in der Diagnose einer Hepatitis C Infektion.
11. Diagnostischer Kit, mindestens eines der Epitope nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfassend.
12. cDNA, eines der HCV-Epitope nach einem der Ansprüche 1 bis 4 kodierend.
13. Impfstoff, mindestens eine cDNA nach einem der Ansprüche 1 bis 4 umfassend.